

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Đurđević

DOKAZIVANJE PRISUSTVA METILKSANTINA U UZORCIMA ČOKOLADE

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Marija Đurđević

DOKAZIVANJE PRISUSTVA METILKSANTINA U UZORCIMA ČOKOLADE

Diplomski rad

Akadska godina: 2017./2018.

Mentorica:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Komentorica:

dr. sc. Maja Veršić Bratinčević, dipl. ing.

Split, rujan 2018.godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

**Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska**

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović
Pomoć pri izradi: dr. sc. Maja Veršić Bratinčević

DOKAZIVANJE PRISUSTVA METILKSANTINA U UZORCIMA ČOKOLADE

Marija Đurđević, broj indeksa: 65

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Kvalitativno dokazati prisutnost metilksantina u uzorcima čokolade i biološkim uzorcima mokraće primjenom GC-MS metode. Utvrditi koja je metoda, SPE ili LLE metoda, prikladnija. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme bioloških uzoraka LLE metodom kod različitih ispitanika.

Materijali i metode: Korišteni su uzorci 11 čokolada (3 tamne i 8 mliječnih čokolada) te biološki uzorci urina tri ispitanika. Uzorci čokolada pripremljeni su SPE metodom, dok su *Dorina čokolada za kuhanje* te biološki uzorci pripremljeni LLE metodom. Svi uzorci su analizirani na GC-MS uređaju.

Rezultati: U 10 uzoraka čokolade te u svim biološkim uzorcima detektirani su teobromin i kofein. Uzorci pripremljeni za analizu LLE metodom dali su bolji signal od uzoraka pripremljenih za analizu SPE metodom. Postoje razlike u signalima metilksantina kod različitih ispitanika.

Zaključci: Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspješno je kvalitativno dokazana prisutnost metilksantina u uzorcima 3 crne i 7 mliječnih čokolada te u biološkim uzorcima mokraće. LLE metoda pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu od SPE metode. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspoređeni su rezultati dobiveni nakon pripreme bioloških uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće kod 3 različita ispitanika. Utvrđeno je kako postoje razlike u rezultatima te je potrebno provesti daljnja ispitivanja usporedbe bioloških uzoraka.

Ključne riječi: metilksantini, kofein, teobromin, čokolada, SPE metoda, LLE metoda, GC-MS metoda, biološki uzorci, mokraća, ispitanici

Rad sadrži: 50 stranica, 17 slika, 1 tablicu, 50 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. doc. dr. sc. Ivana Mudnić | predsjednica Povjerenstva |
| 2. prof. dr. sc. Marija Definis - Gojanović | član |
| 3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović | član-mentor |

Datum obrane: (27. rujna 2018.)

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.
Technical assistance: Maja Veršić Bratinčević, PhD

DETERMINATION OF METHYLYXANTHINES IN CHOCOLATE SAMPLES

Marija Đurđević, index number: 65

Summary:

Objectives: Qualitatively demonstrate the presence of methylxanthines in chocolate samples and biological samples of urine using the GC-MS method. Determine what method, SPE or LLE method, is more appropriate. Compare the results of the analysis obtained after the preparation of biological samples by the LLE method in different subjects.

Materials and methods: Samples of 11 chocolates and biological samples of urine were used. Chocolate samples were prepared by the SPE method, while *Dorina Chocolate for cooking* and biological samples were prepared by the LLE method. All samples were analyzed with GC-MS method.

Results: In 10 chocolate samples and in all biological samples, theobromine and caffeine were detected. Samples prepared for the LLE method analysis provided a better signal from samples prepared for SPE analysis. There are differences in the methylxanthine signals in different subjects.

Conclusion: The presence of methylxanthines in 3 black and 7 milk chocolate samples and in biological samples has been successfully demonstrated. LLE method showed greater efficiency in preparation of samples for analysis. It has been found that there are differences in results obtained after the preparation of biological samples by liquid-liquid extraction in 3 different subjects and a further study of the comparison of biological samples has to be carried out.

Key words: methylxanthine, kaffein, theobromin, chocolate, SPE method, LLE method, GC-MS method, biological samples, urine, subjects

Thesis contains: 50 pages, 17 pictures, 1 table, 50 literature references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Ivana Mudnić, PhD, asist. prof. | Chair person |
| 2. Marija Definis – Gojanović, PhD, full prof. | Member |
| 3. Davorka Sutlović, PhD, full prof. | Supervisor |

Defence date: (September 27, 2018.)

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Metilksantini	2
1.1.1. Kofein	3
1.1.2. Teobromin	4
1.1.3. Proizvodi koji sadrže metilksantine	4
1.1.3.1. Čokolada	5
1.1.3.2. Povijest proizvodnje čokolade	6
1.1.3.3 Vrste čokolade	9
1.2. Određivanje metilksantina u uzorcima	10
1.2.1. Uzorkovanje u toksikologiji	10
1.2.2. Nebiološki uzorci	10
1.2.3. Biološki uzorci	10
1.3. Priprema uzoraka	11
1.3.1. Metode ekstrakcije	11
1.3.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)	11
1.3.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)	13
1.4. Instrumentalna tehnika određivanja	13
1.4.1. Plinska kromatografija (GC)	13
1.4.2. Masena spektrometrija (MS)	14
1.4.3. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS)	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Kemikalije	19
3.2. Uzorci za analizu	19
3.3. Postupci pripreme uzoraka za analizu	20
3.3.1. Postupak pripreme za analizu SPE metodom	21
3.3.2. Postupak pripreme za analizu LLE metodom	22
3.4. Instrumenti	23
3.4.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone	23
4. REZULTATI	25
4.1. Analiza uzoraka tamnih čokolada	26

4.2. Analiza uzoraka mliječnih čokolada.....	26
4.3. Usporedba SPE i LLE metode na uzorku tamne čokolade.....	27
4.4. Koncentracije metilksantina u biološkim uzorcima mokraće.....	28
4.4.1. Koncentracija metilksantina u biološkim uzorcima nakon konzumacije Dorina čokolade za kuhanje	29
4.4.2. Koncentracija metilksantina u biološkim uzorcima nakon konzumacije Milka Alpine Milk mliječne čokolade.....	30
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČCI	37
7. POPIS CITIRANE LITERATURE.....	39
8. SAŽETAK.....	44
9.SUMMARY	46
10. ŽIVOTOPIS	49

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović i komentorici dr. sc. Maji Veršić Bratinčević što su me strpljivo, predano i stručno vodile u izradi ovog rada. Hvala vam na vremenu provedenom u vašem laboratoriju kojeg ću se uvijek rado sjećati.

Hvala svim mojim studentskim kolegama koji su me uvijek rado poticali i bodrili naprijed. Svojim su riječima i djelima olakšali moje studiranje.

Hvala mojoj obitelji i rodbini te mojim prijateljima koji su uvijek bili tu, kad je bilo najteže, tješili me i motivirali, a kad je bilo lakše, zajedno sa mnom slavili uspjehe. Hvala za sve male trenutke od kojih se život sastoji.

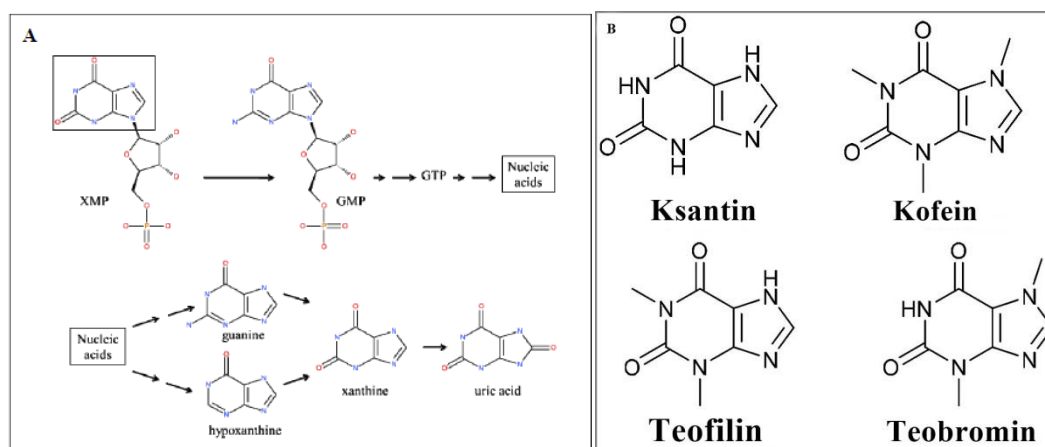
Posebno hvala mojim roditeljima koji su vjerovali u mene i kad sama nisam, na njihovom strpljenju i svim utješnim riječima i na neizmjernoj brizi za mene. Hvala vam za sve vaše molitve, motivirajuće opomene i na neizmjernoj ljubavi i brizi bez koje se ne bih uzdigla iz svojih problema.

Na kraju, ovaj rad posvećujem svima onima kojima je teško, koji ne znaju kako ustati nakon pada i koji nemaju nekoga tko će ih bodriti. Nijedan rad nije uzaludan, makar se njegov rezultat pokazao mnogo kasnije nego ga očekujemo.

1. UVOD

1.1. Metilksantini

Ksantini su različiti spojevi proizvedeni od biljaka i životinja te nisu proučavani tako često kao druge tvari metabolizma, kao ATP ili GTP. Zanimljivo je da ti spojevi pripadaju obitelji purina i sve ih ljudske stanice proizvode. Zapravo, ksantin i njegovi derivati su međuprodukti u proizvodnji GMP-a, GDP-a i GTP-a u stanicama koje ovise o putu spašavanja koji reciklira međuprodukte degradacije natrag u GTP i nukleinske kiseline. Osim toga, ksantin ima ulogu u katabolizmu nukleotida i nukleinskih kiselina, jer je to preteča mokraćne kiseline, što je konačni proizvod katabolizma purina (Slika 1A). Zanimljivo je da prednosti ksantina u kakau uopće nisu povezane s anaboličkim ili kataboličkim metabolizmom purina kod čovjeka. Aktivni spojevi u kakau koji su strukturno slični ksantinu su metilksantini (Slika 1B), višestruko su istraživani te su fiziološki učinkoviti na zdravlje čovjeka. Većina potrošača neće biti svjesna da psihoaktivni učinci uzrokovani konzumiranjem kaka, kave ili čaja proizlaze iz blokade adenozinских receptora. (1)



Slika 1. (A) Ksantin kao intermedijer GTP-u te anabolizam i katabolizam nukleinske kiseline. Pravokutnik u spojevima ističe ksantinsku jedinicu (1); (B) Strukture metilksantina. (2)

Flavonoli i metilksantini su najprepoznatljiviji aktivni sastojci kaka. Flavonoli su polifenolne strukture koje u kakau uključuju katehin i derivate, te B2, B3 i C1 procijanidine. Nedavni interes za ove spojeve proizlazi iz njihovih antioksidativnih svojstava. Zapravo, flavonoli inhibiraju peroksidaciju lipida i utječu na proizvodnju lipida ili derivata lipida koji reguliraju imunološki odgovor, a nedavno se pokazalo kako prehrambeni kakao ublažava

upalu povezanu s pretilošću u miševa s visokim udjelom masti. (3) Čini se da su te molekule ključni igrači u povećanju korisnih crijevnih mikroba (npr. *Lactobacilli*) i smanjenju manje korisnih (npr. *Clostridia*). (4,5) Nabil Hayek (6) je pregledao podatke koji pokazuju da kakao i / ili čokolada mijenjaju crijevnu floru na isti način kao i prebiotici i probiotici. Budući da se funkcionalna interakcija između crijevne mikroflore i metabolizma domaćina doista pokazala u nekoliko studija, primjerice kod studije Tremaroli i sur. (7), te rezultiraju održavanjem zdravlja, neke od prednosti kakaa mogu biti posljedica ovog neizravnog mehanizma.

Metilksantini, djelujući na adenzinske receptore u središnjem živčanom sustavu, povećavaju razinu uzbuđenja, raspoloženja i koncentracije. (8) Mnogi od lijekova uključeni u ljudsku "prehranu" imaju za cilj neurone u središnjem živčanom sustavu i proizvode različite psihoaktivne, psihomotorne i neuroplastične učinke. Istraživanje Schiffmana i sur. (9) pokazalo je da prilagodba ljudskog jezika prema metilksantinima jača okus. Koncentracije spojeva upotrijebljenih u istraživanju bile su dovoljne da blokiraju adenzinske receptore, osobito podtip A1, a ne utječu na aktivnost fosfodiesteraze. Rezultati su bili važni za identifikaciju adenzinskih receptora kao modulatora percepcije okusa.

1.1.1. Kofein

Kofein (1,3,7-trimetilksantin) i teobromin (3,7-dimetilksantin) dolaze u pićima kao što su kava, čajevi i kole. (10) Teofilin (1,3-dimetilksantin) dolazi u raznim listovima čajeva. (11) Metabolizam kofeina u ljudskom sustavu uključuje formiranje i teobromina i teofilina. Kofein, teobromin i teofilin posjeduju svojstva blagih stimulansa središnjeg živčanog sustava. Kofein također djeluje kao diuretik i može prouzročiti miokardijalnu i respiratornu stimulaciju. Učinci teobromina i teofilina su manje izraženi od kofeina. (12) Objavljene su studije o koncentracijama dostupnih kofeina u uzorcima specijalnih napitaka dobivenih na prodajnim mjestima. (13,14) Ova su izvješća, koja se odnose na uzorke kave s i bez kofeina, koristila ekstrakciju tekuće - tekuće, koju je slijedila plinska kromatografija i detekcija dušik-fosfor (GC-NPD) u analizi. Određivanje ksantina u oba pića i iz bioloških uzoraka također je

opisano korištenjem tankoslojne kromatografije (15), tekućinskom kromatografijom (LC) (16) i masenom spektrometrijom (MS) (17).

1.1.2. Teobromin

Teobromin je metilksantin prisutan u velikim količinama u čokoladi i kakau. Manje je proučavan od ostalih prirodnih metilksantina jer stimulira središnji živčani sustav u manjoj mjeri. Ipak, potrošnja teobromina ima zdravstvene koristi, uključujući zaštitu površine cakline i suzbijanje kašlja. Nadalje, pokazalo se da teobromin povećava koncentraciju HDL kolesterola i smanjuje koncentraciju LDL kolesterola u plazmi, dajući kardiovaskularnu zaštitu i smanjujući rizik od koronarne bolesti srca. Primarni metaboliti teobromina su 3-metilksantin, 7-metilksantin, 7-metilna kiselina i 3,7-dimetilna kiselina, a 18-21% ostalo je nepromijenjeno. (18)

Farmakološka ispitivanja potvrđuju da je teobromin manje aktivan od kofeina. Teobromin ima dva do tri puta niži afinitet od kofeina za A1 i A2 adenozijske receptore i očito je manje učinkovit kao inhibitor fosfodiesteraze. Nadalje, njihova se farmakokinetika značajno razlikuje. Kofein je visoko topljiv u vodi, vršne koncentracije u krvi postiže 30-40 minuta nakon ingestije i ima poluvijek eliminacije 2,5-5 sati, a teobromin je topiv u mastima, postiže vršnu koncentraciju u krvi 2-3 sata nakon ingestije i procjenjuje se poluvijek eliminacije 7 do 12 sati. Kofein lakše prodire u krvno-moždanu barijeru od teobromina. Teobromin, s druge strane, je snažniji stimulator srca od kofeina i bio je ranije korišten kao dilatator koronarnih arterija u dnevnim dozama od 300 do 600 mg. (19)

1.1.3. Proizvodi koji sadrže metilksantine

Danas se metilksantini smatraju glavnim aktivnim sastojcima u kakau, kavi i čaju. Osim polifenola, kakao je bogat metilksantinima, kofeinom, teobrominom i teofilinom. (20) Teobromin je glavni metilksantin prisutan u kakau, dok je sadržaj kofeina oko 0,2 %. (21)

U tamnoj čokoladi nalazi se visoki udio teobromina i kofeina, pri čemu je veći udio teobromina. (20) Udio kofeina u kakau je mali u usporedbi s udjelom kofeina u kavi i čaju. (22)

1.1.3.1. Čokolada

Jedna od najslađih svjetskih poslastica, čokolada je hrana napravljena od zrna kakao stabla. Kakao stabla potječu iz prašuma Južne i Srednje Amerike. Prvi su je kultivirali Mezoamerikanaci. Koristili su kakao zrna za stvaranje pjenušavog čokoladnog pića sa začinima. Kad su Europljani otkrili tajnu kakao stabla, čokolada je postala važna roba. Danas, dva glavna čokoladna proizvoda su kakao za pripravu napitka te čokolada kao slatkiš, iako se čokolada može koristiti kao dodatak brojnim desertima kao što su keksi, torte i brownies. Također je otkriveno kako je čokolada koristan dodatak pojedinim lijekovima. Kakao maslac koristi se u kozmetičkim preparatima, uljima te kao premaz (coating) za pilule. Često se povezuje s brojnim religioznim i nacionalnim praznicima i slavlјima, kada se tradicionalno daruje kao poklon voljenima i prijateljima. Čokolada je i simbol ljubavi i predanosti pa se poklanja voljenoj osobi za Valentinovo (23).



Slika 2. Kakao u različitim oblicima: kakao prah, kakao zrnca, kakao maslac i čokolada (24)

Kakao stabla uzgajali su Azteci mnogo prije dolaska Europljana. Kakao zrna koristila su se kao valuta te za pripremu začinenog napitka „Chocolatl“. Čokolada se pripremala otapanjem kakao zrna u keramičkim loncima prije mljevenja kamenjem. Takvoj smjesi bi se dodala hladna voda, uz dodatke ljutih začina ili meda i mješalo se do pjenušave konzistencije. (25) Prva kakao zrna u Europu je donio Kolumbo iz znatiželje, a kasnije ju je Don Cortez komercijalno iskoristio kao novo piće. (26) Španjolci su preferirali slatko piće i kao takvo se proširilo srednjom i sjevernom Europom. Mješavina kakao zrna i šećera jest tvrda supstanca koja nije ugodna jezičnim pupoljcima, a za postizanje lakoće topljenja, bio je potreban dodatak masti. To se može dobiti pritiskom kakao zrna i uklanjanjem dijela masnog sadržaja, poznatog kao kakao maslac. Mogućnost ekstrahiranja navedenih masnoća razvijena je 1828. godine, a razvio ju je Nizozemac Van Houten. Izdvojena masnoća koristila se za izradu čvrste čokoladice (chocolate bar), dok se preostali kakao prah s niskim udjelom masnoća može iskoristiti za pripremu pića. Ovakva „čokolada za piće“ zapravo se više preferirala od originalne mješavine zbog manje masnoća. (27).

1.1.3.2. Povijest proizvodnje čokolade

Godine 1847., u Bristolu u Engleskoj, Fry je koristio tada razvijene parne strojeve kako bi pokrenuo prvu tvornicu čokoladica te je zaslužan za izum prve čokoladice koja je sadržala kakao zrna, šećer i kakao maslac. (28)

Izum čvrstog oblika mliječne čokolade pripisuje se Danielu Peteru. U Švicarskoj 1875. godine strojevi na vodu radili su u dugim vremenskim intervalima po povoljnoj cijeni što je omogućilo da se bez velikih dodatnih troškova iz čokolade odstrani višak vode iz mlijeka. Čokolade sa sadržajem vlage malo iznad 2% su neprihvatljive zbog siromašne teksture i loše kvalitete čuvanja (27). Kao što vlažnost od 2 % proizvoda može skratiti njegov rok trajanja, to također može i neravnomjerna tekstura. To znači da je Peter morao pronaći način sušenja bogate opskrbe tekućeg mlijeka koje je pronašao u svojoj državi. U tome mu je pomoglo nedavno otkriće formule kondenziranog mlijeka, a patentirao ga je Henri Nestlé. Bilo je potrebno evaporirati manje vode, a ostatak se je mogao ukloniti korištenjem relativno jeftinog stroja na vodu. U to vrijeme, većina se mliječnih čokolada koristila za izradu pića. (29)

Kako bi čokolada bila mekana dok se topi u ustima, čvrste, nemasne čestice moraju biti manje od 30 μm . Čokolade koje su proizvodili Fry i Peter napravljene su korištenjem granitnih valjaka, ali i dalje su imale krutu teksturu. Ovo je posljedica prisutnosti većih čestica te masnoća nije dobro pokrivala čestice. (29)

Rodolphe Lindt je u svojoj tvornici u Bernu u Švicarskoj 1879. godine izumio stroj koji je proizvodio mekšu čokoladu boljeg okusa, a stroj je nazvao «*konča*» zbog izgleda kao školjka volak (eng. *conch*). Sastojao se od granitnog kanala s valjkom koji je gurao toplu tekuću čokoladu naprijed i natrag nekoliko dana. Ovo bi razbilo nakupine i veće čestice i obložilo ih mašću. Istovremeno, vlaga bi isparila u zrak, stvarajući mekšu čokoladu. (30)

Tablica 1. Ostali važni događaji u industriji proizvodnje čokolade. (28)

Godina	Događaj
1900	Mliječna čokolada postala je hrana za svakoga: potvrdile su švicarske tvornice čokolade Lindt & Sprüngli, Tobler Suchard
1905	Cadbury prodaje „Dairy Milk“ čokoladu
1907	Herhey u Americi proizvodi „Kisses“
1914	U Francuskoj se pojavila Banania: sadrži kakao prah, šećer i nasjeckanu bananu
1922	Buitoni u Italiji proizvod „Kiss“
1923	U SAD-u, Frank Mars proizvodi „Milky Way“
1925	Callebaut proizvodi prvi omot za čokoladu. U New Yorku je osnovana Cocoa Exchange za trgovanje sirovinom i SAD je postao jedan od vodećih svjetskih proizvođača čokolade
1943/5	Američke trupe u Europi distribuiraju svoje čokoladice
1950-1975	U Francuskoj Robert Linxe osnovao je Valrhonu i Maison du Chocolat te vratio Francuzima nadmoć u kvaliteti čokolade 1950. spajanjem „Uniona“ i „Bizjaka“ osniva se najveća tvornica čokolade i keksa u jugoistočnoj Europi, „Josip Kraš“ 1951. Otvorena tvornica „Zvečevo“
1956	Proizvedena „Mon Cheri“, prva Boerova čokolada proizvedena industrijski
1963	Rud Läderach, u laboratoriju Ennetbühl, izumio je "šuplje" kalupe za praline
1964	Dana 20.travnja u promet je puštena prva teglica Nutelle
1974	Proizvodnja Kinder jaja
1984	Raymond Bonnat i Voiron kreirali su prvu kolekciju tamnog „Grands Crus de Cacao“
1988	Varlhona Guanaja kreirali su čokoladicu koju su opisali poput vina, označavajući je kao „grand cru“, jedinstvenog podrijetla 1989 Lindt je u talijanskim supermarketima prodavao čokoladice sa 70% kakaa
1993/95	Prvi Salon čokolade u Parizu, prvo izdanje Euročokolade u Perugiji
1998-2000	Amedei i Domori u Italiji distribuiraju „cru“ čokoladice

1.1.3.3 Vrste čokolade

Tamna čokolada uz intenzivnu i postojanu aromu kaka, izgleda svijetlo i sjajno, topi se u ustima ostavljajući ugodni gorki okus. Trebala bi biti glatka na dodir - svilen, nikad zrnata. Postotak kaka je jedna od glavnih značajki koje određuju njenu kvalitetu. Najbolje čokolade iz ove skupine sadrže barem 70% kaka. (28)

Mliječna čokolada sadrži ne manje od 20-25% kaka. (28) svjetlosmeđe boje i mekane konzistencije. Dobivena je od kaka i šećera uz dodatak mlijeka, vrhnja, vrhnja u prahu, mlijeka u prahu, mliječne masti i lecitina. Može sadržavati i kakao maslac. Mliječna čokolada sadrži oko 25% masti i do 55% šećera. (31)

Gianduja (đanduja) jest smeđa čokolada, a dobiva se spajanjem lješnjaka, kaka i šećera. Ponekad se dodaju mlijeko, bademi ili orasi. Gianduja je prvi put napravljena u Torinu sredinom 19. stoljeća. (28)

Bijela čokolada sadrži kakao maslac, šećer, mlijeko u prahu i vaniliju. Okus je sladak, pri sobnoj temperaturi čokolada je tvrda, dobro se lomi i odlično topi u ustima. Približno 8 grama teška tablica bijele čokolade sadrži puno kalcija, fosfora i vitamina B2. (32) Osim jestivih proizvoda, čokolada se može koristiti i za druge namjene, kao što je kozmetika, zbog svojstava kakaovog maslaca. (28)



Slika 3. Tamna, mliječna, bijela i gianduja čokolada.

1.2. Određivanje metilksantina u uzorcima

1.2.1. Uzorkovanje u toksikologiji

Uzorak jest svaki materijal koji je nastao u operativnom sustavu za ispitivanje tijekom analize ili čuvanja. Ispitivana tvar je ona tvar koja se analizira dok je usporedna tvar svaka tvar (standard) koja se koristi za usporedbu s ispitivanom tvari (33). Jedan od najvažnijih postupaka toksikološke analize, a koji ima značajan utjecaj na rezultat analize, jest način uzimanja uzoraka, odnosno uzorkovanje (34). Uzorci za toksikološku analizu mogu biti nebiološki i biološki. U ovom radu nebiološki uzorci su uzorci različitih vrsta čokolada, a biološki uzorci su uzorci mokraće ispitanika.

1.2.2. Nebiološki uzorci

Za razliku od bioloških uzoraka, nebiološke uzorke karakteriziraju manje molekule, kao i manja kompleksnost sustava pa su rjeđe interferencije među molekulama. Analiza se najčešće koristi za identifikaciju, određivanje kvantitativnog sastava, stupnja čistoće i stabilnosti nekog sustava ili za ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava tvari u sustavu. Ovakva je analiza jednostavnija i jeftinija (35).

1.2.3. Biološki uzorci

Uzorci za toksikološku analizu živih uzoraka zapravo su biološki uzorci te u 98% slučajeva to su mokraća, krv i želučani sadržaj. Ostatak otpada na kosu, slinu i nokte te se u posebnim slučajevima mogu koristiti i druge tjelesne tekućine.

Mokraća je svijetložuta tekućina koja se izlučuje bubrezima, a sadrži vodu, soli te produkte metabolizma. Najprikladniji je uzorak jer je koncentracija tvari i njenih metabolita u uzorku najveća i najlakša za identifikaciju. Najčešće se koristi pri analizama na prisutnost

droga i alkohola. Prikuplja se u plastičnu posudu na kojoj može biti i traka za mjerenje pH i temperature mokraće te koncentraciju kreatinina. Važno je naglasiti kako je manipulacija mokraćom najjednostavnija, a ona uključuje dodavanje raznih sredstava koja kasnije otežavaju analizu i pridonose maskiranju potencijalno prisutnih droga u uzorku. Zbog navedenog, prikupljanje mokraće potrebno je provoditi u strogo kontroliranim uvjetima (34).

1.3. Priprema uzoraka

Prije instrumentalne analize odgovarajućom analitičkom metodom potrebno je izolirati tvari od interesa iz biološkog i/ili nebiološkog materijala. Biološki su materijali kompleksni te njihove endogene komponente mogu interferirati s analitom stoga ih je prije analize potrebno ukloniti. Također, koncentracije traženih tvari često su vrlo niske te ih je prije analize potrebno dodatno koncentrirati (36)

1.3.1. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je analitička metoda razdvajanja analita iz smjese, a utemeljena je na razdiobi analita između dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija čvrstom fazom najčešće se koriste za ekstrakciju analita iz bioloških uzoraka. Ekstrakcijske metode provode se za pripremu uzoraka za kvalitativno i kvantitativno određivanje analita kromatografskim metodama. (37)

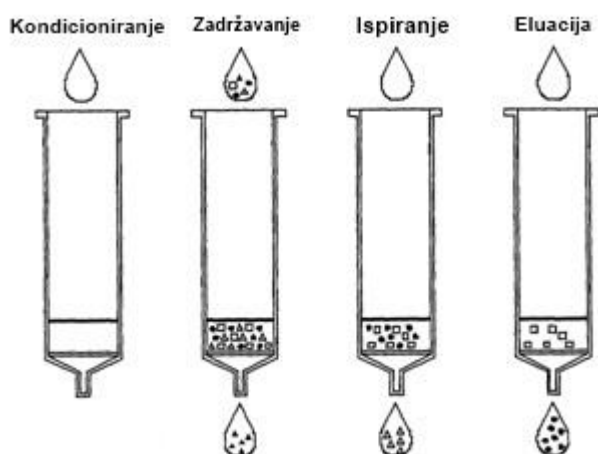
1.3.1.1. Ekstrakcija čvrstom fazom (eng. Solid phase extraction, SPE)

Ekstrakcija čvrstom fazom jest fizikalni proces koji se odvija između tekuće i čvrste faze, a koristi se za odjeljivanje organskih spojeva iz biološkog materijala na temelju njihovih različitih afiniteta za stacionarnu fazu u kolonama. Analit otopljen u otapalu (tekuća faza) ima

veći afinitet za čvrstu fazu nego samo otapalo. To znači da kad uzorak prođe kroz kruti nosač, analit se koncentrira na površini čvrste faze dok ostatak uzorka slobodno prolazi kroz kolonu. (38)

Postupak SPE odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak jest kondicioniranje kolone organskim otapalom kako bi došlo do oslobađanja vezanih funkcijskih skupina, aktiviranja ugljikovodikovih lanaca i uklanjanja organskih ostataka s nosača. Nanošenje uzorka drugi je korak kojim se uzorak lagano propušta pod laganim vakuumom. Protok normalno iznosi 1,5 ml/min. Slijedi pranje kolone kako bi se uklonili ostaci otapala i ostale nečistoće, a zatim se analit eluira s nosača otapalom iznimno velike elucijske moći (39). Važno je napomenuti kako se polarni analiti zadržavaju na polarnim nosačima koji se ispiru vodenim, a eluiraju organskim otapalima (normalna faza), dok se nepolarni analiti zadržavaju na nepolarnim nosačima koji se ispiru organskim, a eluiraju vodenim otapalima (rezervna faza).

Danas se za nosače koriste razni materijali niske specifičnosti (kemijski vezani silikati, porozni polimeri, nosači na bazi ugljika) ili visoko specifični nosači za određeni kemijski spoj (ionski izmjenjivači, nosači ograničenog pristupa, makrociklički nosači, imunoafinitetni nosači, molekulski tiskani polimeri). (39)



Slika 4. Priprema uzorka metodom ekstrakcije čvrstom fazom (SPE) (40)

1.3.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće (eng. Liquid – liquid extraction, LLE)

Ekstrakcija tekuće-tekuće je postupak kojim se otopljena tvar raspodjeljuje između dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju. Temelji se na razlikama u pH vrijednosti i topljivosti analita u matrici i organskom otapalu pri određenom pH.

Za uspješnu ekstrakciju važan je pravilan odabir organskih otapala, čemu pogoduje poznavanje kemijskih svojstava lijeka ili ispitivane toksične tvari. Kiseli spojevi su relativno netopljivi u kiselom mediju i uglavnom se mogu ekstrahirati iz kiselih vodenih otopina u organsko otapalo pri čemu bi pH medija trebao biti dvije pH jedinice ispod pK_a analita. Bazni spojevi su uglavnom netopljivi u alkalnim otopinama i mogu se ekstrahirati iz alkalnih vodenih otopina u organsko otapalo. Neionizirani spojevi prelaze iz vodenog okruženja u organsko otapalo, dok ionizirane komponente poput proteina ostaju u vodenom sloju. Najčešće korištena otapala su heksan, toluen, dietileter, klorbutan, diklormetan, kloroform i njihove smjese (36).

Ovo je jedna od najčešće korištenih metoda pripreme uzorka jer je relativno jednostavna i brza. Najveći nedostaci metode su niska selektivnost, ograničen broj otapala koji se međusobno ne miješaju te potrošnja velikih količina organskih otapala (41).

1.4. Instrumentalna tehnika određivanja

1.4.1. Plinska kromatografija (eng. Gas chromatography, GC)

Plinska kromatografija jest najčešće korištena metoda za kvalitativnu te kvantitativnu analizu spojeva koji isparavaju na raznim temperaturama kolone (do 300°C), a da pri tom ne dođe do njihove razgradnje (42). To je tip kolonske kromatografije u kojoj je stacionarna faza tekućina ili krutina imobilizirana na inertnom nosaču stijenske kapilarne kolone, dok je mobilna faza kemijski inertan plin. Kao mobilna faza koriste se helij, dušik, vodik, argon i ugljikov dioksid.

Prvi korak je uparavanje uzorka, a zatim se injektira na početku kolone i potiskuje kroz nju nošen mobilnom fazom pod povišenim tlakom. Sastojci uzorka se razvajaju na koloni temeljem različitih fizikalno-kemijskih svojstava te se u različitom vremenu detektiraju na detektoru. Osjetljivost detektora mjeri se odnosom visine pika – S (engl. Signal) i visine bazne linije – N (engl. Noise) te se označava omjerom S/N. Svaki detektor ima određeno linearno radno područje u kojem je količina analita proporcionalna dobivenom signalu (43).

1.4.2. Masena spektrometrija (eng. Mass spectrometry, MS)

Masena spektrometrija instrumentalna je metoda identifikacije kemijskih struktura kroz dva procesa: ionizaciju uzorka i razdvajanje fragmenata djelovanjem magnetskog polja (44). Uzorak se uvodi u ionizator gdje se molekule i/ili fragmenti molekula ioniziraju. Na nastale plinovite ionizirane molekule i ionizirane fragmente molekula djeluje se magnetnim ili elektronskim poljem. Ioni se razdvajaju prema odnosu mase i naboja (m/z). Razdvojeni se ioni detektiraju na detektoru, a nastali električni signal se pohranjuje u obliku omjera m/z koji se zapisuje na pisaču (37).

1.4.3. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (eng. Gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS)

Plinska kromatografija sa spektrometrom masa (GC-MS) je zlatni standard kod kvantitativne i kvalitativne forenzične i kliničke analize lijekova, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Spektrometar masa pogodan je za kvalitativnu analizu, a plinska kromatografija za odjeljivanje i kvantifikaciju smjesa. Karakteristični podatci dobiveni korištenjem GC–MS su vrijeme zadržavanja i površina ispod pika koja je proporcionalna količini sastojka (37). Ova metoda omogućuje najučinkovitije razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju hlapljivih i poluhlapljivih metabolita u biološkim uzorcima. Također je pogodna za provedbu kemijske derivatizacije uzorka, pri čemu se poboljšava hlapljivost i termička stabilnost komponenti uzorka. Sprema kromatografskih i spektrometrijskih tehnika

povećava njihovu pojedinačnu specifičnost i osjetljivost. Zbog niskog limita detekcije pogodnija je od klasičnih kvantifikacijskih biokemijskih metoda (45).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su:

1. Kvalitativno dokazati prisutnost metilksantina u uzorcima čokolade primjenom GC-MS metode.
2. Dokazati prisutnost metilksantina u biološkim uzorcima mokraće primjenom GC-MS metode.
3. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme uzoraka čokolade različitim ekstrakcijskim metodama, (ekstrakcija čvrstom fazom i ekstrakcija tekuće-tekuće) te utvrditi koja je metoda prikladnija za pripremu uzoraka koji sadrže metilksantine.
4. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme bioloških uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće kod različitih ispitanika.

3. MATERIJA I METODE

3.1. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat, Merck, Darmstadt, Njemačka

Voda, redestilirana, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

3.2. Uzorci za analizu

U ovom su istraživanju korišteni uzorci 11 čokolada u obliku čokoladnih pločica te biološki uzorci mokraće triju ispitanika izuzetih nakon konzumacije čokolada. Od 11 uzoraka čokolada, 3 su čokolade bile tamne, a 8 preostalih mliječne čokolade.

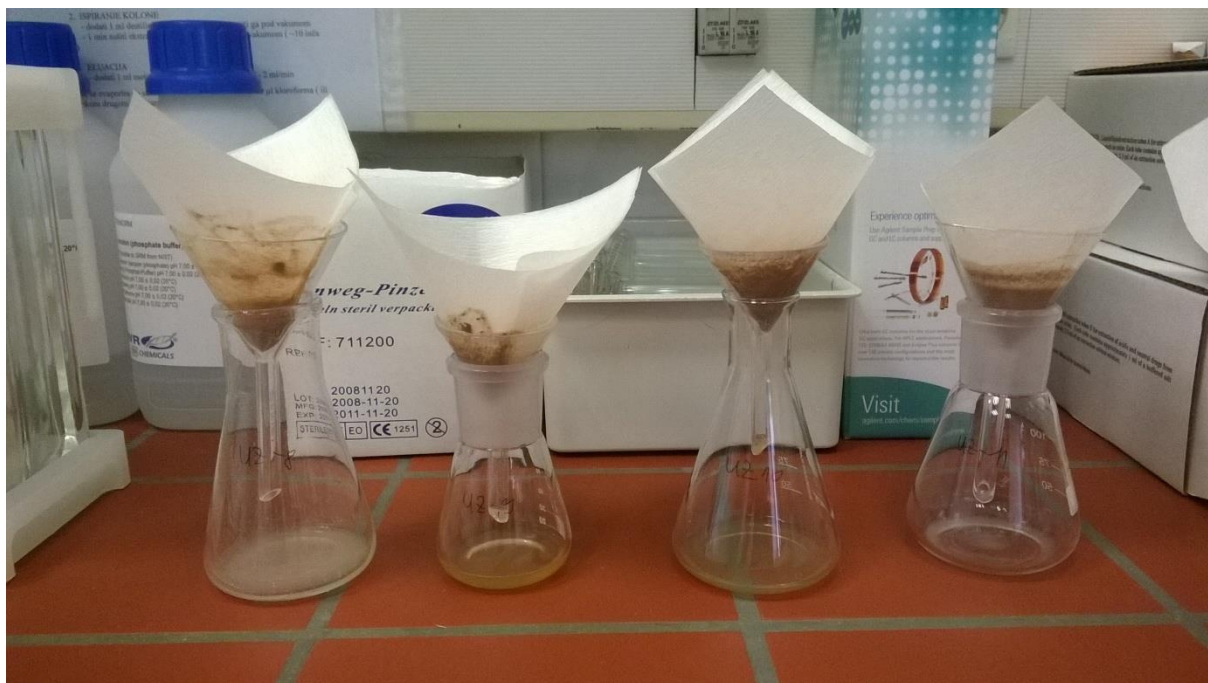
Uzorci:

- Uzorak 1: *S – Budget* čokolada za kuhanje
- Uzorak 2: *Kinder Riegel* mliječna čokolada
- Uzorak 3: *Schogetten* mliječna čokolada
- Uzorak 4: *Milka Noisette*, mliječna čokolada
- Uzorak 5: *Seka Zvečevo*, mliječna čokolada
- Uzorak 6: *Kandi Chocodream Milk*, mliječna čokolada
- Uzorak 7: *Milka Alpine Milk*, mliječna čokolada
- Uzorak 8: *Mikado* mliječna čokolada
- Uzorak 9: *Dorina* čokolada za jelo i kuhanje
- Uzorak 10: *Loacker Dark – Noir*, tamna čokolada
- Uzorak 11: *Loacker Milk*, mliječna čokolada

U istraživanju su se koristili i biološki uzorci mokraće. Tri ispitanika konzumirali su 30 g Dorina crne čokolade za kuhanje te 30 g Milka Apline Milk mliječne čokolade. Prvi dan ispitanici su konzumirali crnu, a drugi dan mliječnu čokoladu. Uzorak mokraće uzimao se natašte, 1 sat nakon ingestije te 2 sata nakon ingestije čokolade. Kako bi podaci bili što mjerodavniji, 12 sati prije davanja prvog uzorka, ispitanici nisu smjeli konzumirati proizvode koji sadržavaju metilksantine. Uzorci su analizirani kako bi se odredilo prisustvo metilksantina.

3.3. Postupci pripreme uzoraka za analizu

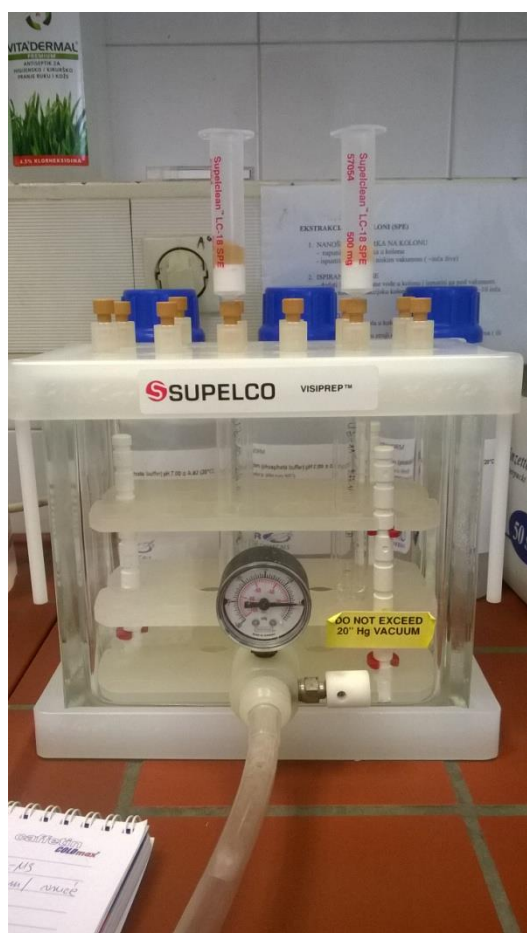
Uzorci čokolade pripremljeni su na način da se 1 g uzorka otopi u 10 ml vruće vode nakon čega se svi uzorci profiltriraju.



Slika 4. Priprema uzoraka za analizu

3.3.1. Postupak pripreme za analizu SPE metodom

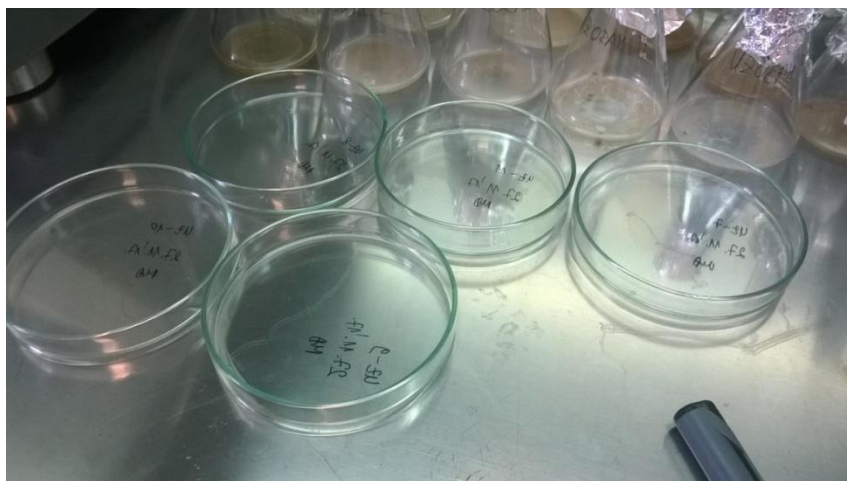
Postupak ekstrakcije čvrstom fazom vršio se pomoću komercijalnih kolona za SPE, Bond Elut Certify tvrtke Agilent Technologies, SAD Supelci, preko Visiprep vakuum kade za ekstrakciju (slika 5). Kolone su kondicionirane s 1 ml metanola i 1 ml vode. Uzorak (1 ml) je propušten kroz kolonu polagano pod niskim tlakom (5 mm Hg). Kolona je zatim isprana s 1 ml vode, te je ostavljena na sušenju 1 minutu. Slijedi elucija metanolom koji je u struji dušika isparen do suha, a suha tvar je otopljena u 30 μ l kloroforma te smještena u staklene tubice za GC-MS analizu.



Slika 5. Vakuum kada za ekstrakciju.

3.3.2. Postupak pripreme za analizu LLE metodom

Za analizu bioloških uzoraka pripremljena je „in house“ LLE tehnika. U tubice za ekstrakciju s navojem doda se 0,9 g natrijevog volframata dihidrata i 3 ml smjese diklormetan/etilacetat (v/v=3:1). U tubice se zatim doda po 1 ml uzorka. Tako pripremljeni uzorci ekstrahirani su na rotoru za ekstrakciju 10 min (50 rpm) te centrifugirani 15 min (2600 okretaja/min). U petrijevu zdjelicu se izdvoji 2,5 ml organske faze te evaporirano u digestoru do suha (slika 6). Uzorci su otopljeni i razrijeđeni u kloroformu do konačnog volumena od 30 μ l te prebačeni u staklene tubice za GC/MS analizu (slika 7).



Slika 6. Evaporacija uzoraka u digestoru do suha



Slika 7. Tubice uzoraka za GC/MS analizu

3.4. Instrumenti

U istraživanju su korišteni sljedeći instrumenti:

- Plinski kromatograf s masenim spektrometrom; Shimadzu GCMS-QP2010
(Slika 8)

- Centrifuga Centric; Tehnica

- Digitalna tehnička vaga; Kern; mjerenje na 3 decimale

- Rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA

3.4.1. Radni uvjeti GC-MS kromatografske kolone

Kromatografska analiza pripremljenih ekstrakata izvedena je na plinskom kromatografu sa spektrometrom masa metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području od 40 – 600 m/z i snimanje samo odabranih iona (engl. *Single ion monitoring*, SIM). Optimiran je temperaturni program.

Optimalni radni uvjeti:

- volumen injektiranja: 1 μ L (splitless)
- temperatura injektora: 250 $^{\circ}$ C
- protok plina nosioca: 1,5 mL/min

Ukupno trajanje temperaturnog programa je 29 minuta i to:

- 1) 90 $^{\circ}$ C izotermno 3 min
- 2) 20 $^{\circ}$ C /min do 270 $^{\circ}$ C
- 3) 270 $^{\circ}$ C izotermno 15 min.

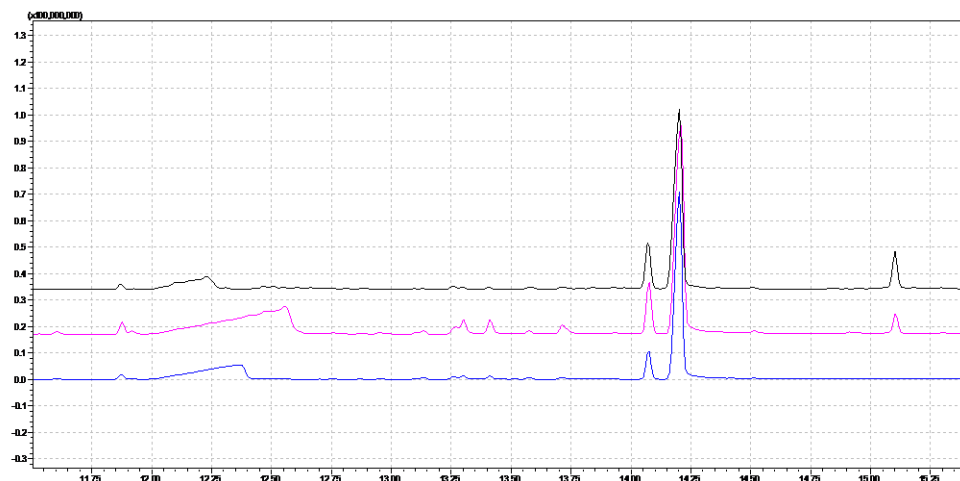


Slika 8. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa; Shimadzu GCMS-QP2010 (46)

4. REZULTATI

4.1. Analiza uzoraka tamnih čokolada

Analizom uzoraka uzetih od 3 različite tamne čokolade ispitivalo se koja od uzorkovanih čokolada ima višu koncentraciju metilksantina.

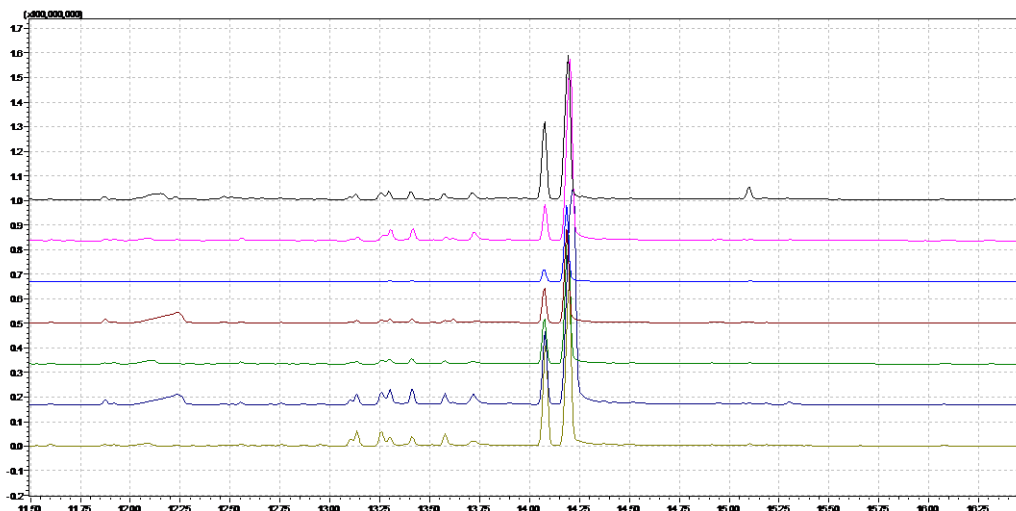


Slika 9. Usporedba uzoraka tamnih čokolada: crna linija - S – Budget čokolada za kuhanje, roza linija - Dorina čokolada za jelo i kuhanje, plava linija - Loacker Dark – Noir, tamna čokolada.

Utvrđeno je kako najbolji odziv i najviši „peak“ metilksantina teobromina, tj. najvišu koncentraciju daje Dorina čokolada za jelo i kuhanje.

4.2. Analiza uzoraka mliječnih čokolada

Analizom uzoraka 8 različitih mliječnih čokolada ispitivalo se koja od uzorkovanih čokolada ima višu koncentraciju metilksantina.

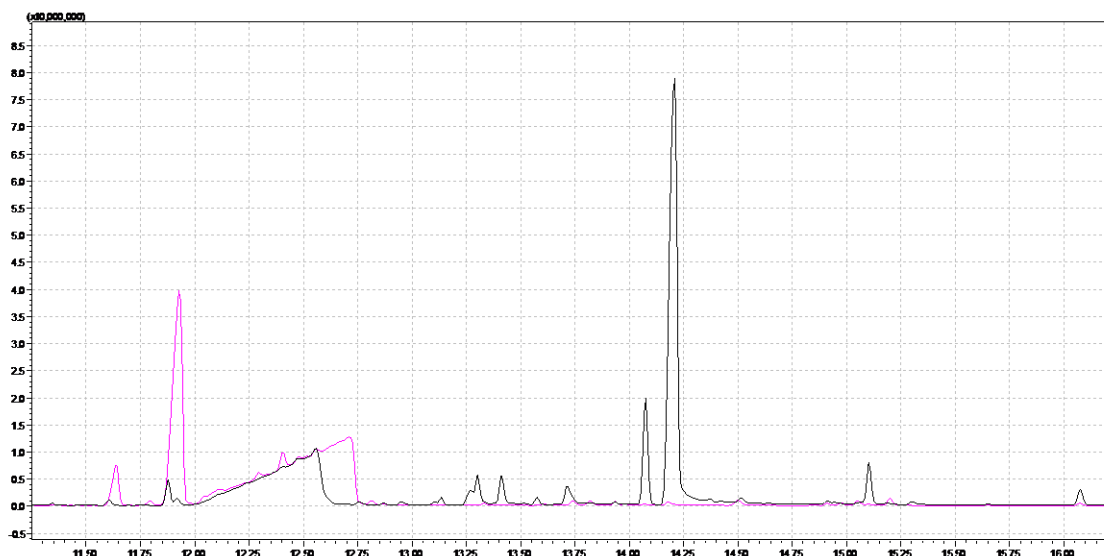


Slika 10. Usporedba uzoraka mliječnih čokolada: crna linija - Kinder Riegel, roza linija – Schogetten mliječna čokolada, plava linija - Milka Noisette, smeđa linija - Seka Zvečevo, zelena linija - Kandi Chocodream Milk, modra linija - Milka Alpine Milk, svijetlo zelena linija Mikado mliječna čokolada.

Utvrđeno je kako najbolji odziv i najviši „peak“ metilksantina teobromina, tj. najvišu koncentraciju daje Milka Alpine Milk, mliječna čokolada. Uz to, iz kromatograma je isključena Loacker Milk mliječna čokolada jer analizom nije dala nikakav odziv.

4.3. Usporedba SPE i LLE metode na uzorku tamne čokolade

Analizom uzorka Dorina čokolade za jelo i kuhanje metodama SPE i LLE željelo se pokazati daje li uzorak dobiven LLE metodom jednak ili bolji odziv na aparatu od uzorka dobivenog SPE metodom. Navedenu analizu se provodilo u svrhu daljnjeg istraživanja na biološkim uzorcima za koje je potrebna priprema uzoraka LLE metodom.



Slika 11. Usporedba SPE i LLE metode na uzorku tamne čokolade. Crna linija – SPE metoda, roza linija – LLE metoda.

Crna linija – SPE metoda; roza linija – LLE metoda
 Rezultat analize jest da uzorak pripremljen LLE metodom daje dobar odziv i „peak“ metilksantina na GC-MS uređaju. Najveći „peak“ crne linije predstavlja trimetilsilanol koji nije bio predmet ovog istraživanja, stoga se zanemaruje njegov odziv.

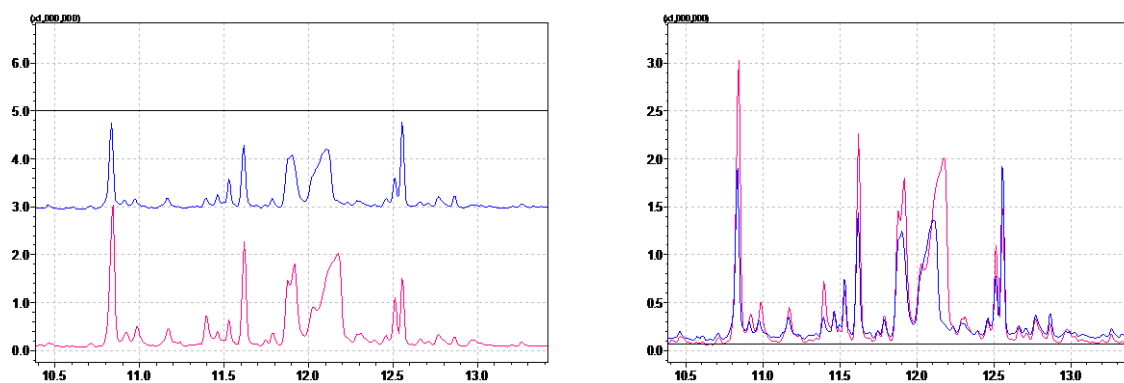
4.4. Koncentracije metilksantina u biološkim uzorcima mokraće

Tri osobe (u ovom istraživanju su imenovane ispitanik 1, 2 i 3) dobrovoljno su pojele određenu jednaku količinu (30 grama) tamne i mliječne čokolade te im je izuzeta mokraća na analizu. Izuzeto je i analizirano ukupno osamnaest uzoraka, prvi uzorak prije konzumacije, drugi uzorak 1 sat nakon konzumacije te treći uzorak 2 sata nakon konzumacije, posebno za tamnu, odnosno mliječnu čokoladu za svakog ispitanika posebno.

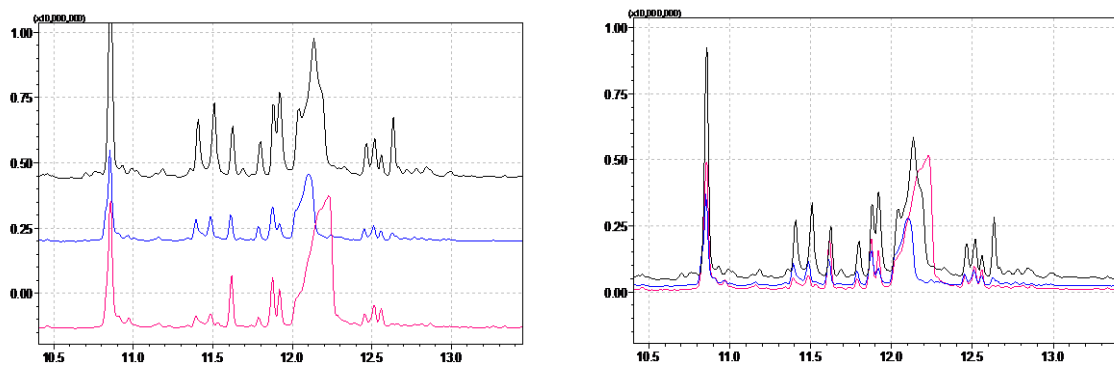
4.4.1. Koncentracija metilksantina u biološkim uzorcima nakon konzumacije Dorina čokolade za kuhanje

Na slikama 12 – 14 prikazani su rezultati dobiveni za 3 uzorka mokraćne ispitanika.

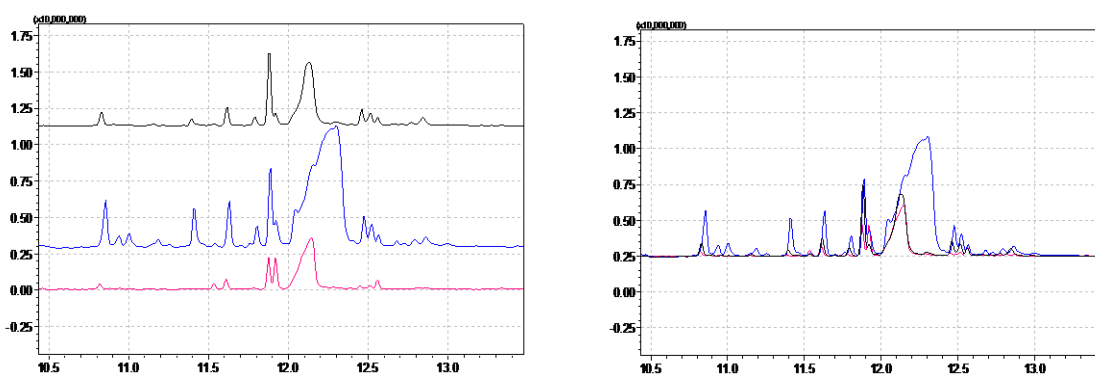
Na kromatogramu su vidljivi signali s pripadajućim retencijskim vremenima. Retencijsko vrijeme kafeina je 11,88, a teobromina 12,56. Vidljiv je porast koncentracija kafeina i teobromina, mjeren visinom – površinom signala, ovisno o vremenu uzimanja biološkog uzorka. Nakon 1 i 2 sata od konzumacije vidljiv je bolji odziv metilksantina.



Slika 12. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 1. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Dorina čokolade za kuhanje.



Slika 13. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 2. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Dorina čokolade za kuhanje.

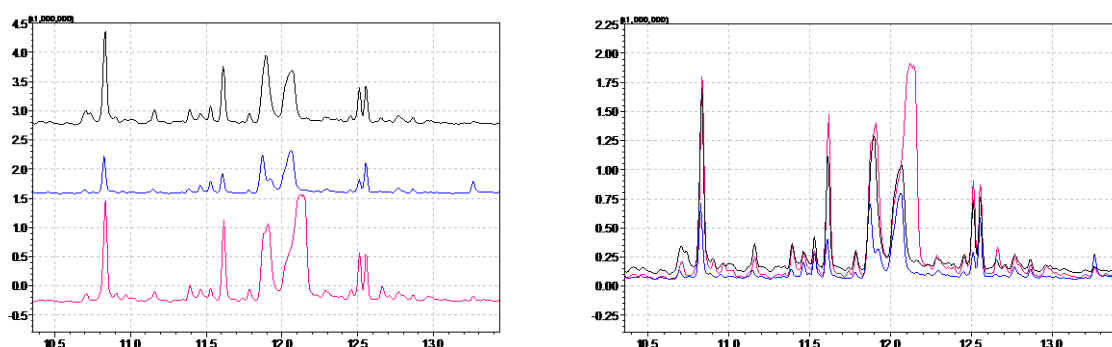


Slika 14. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 3. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Dorina čokolade za kuhanje.

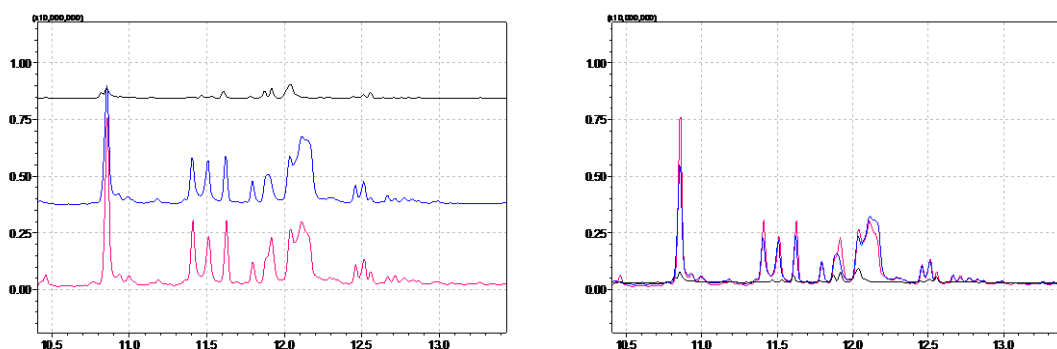
4.4.2. Koncentracija metilksantina u biološkim uzorcima nakon konzumacije Milka Alpine Milk mliječne čokolade

Na slikama 15 – 17 prikazani su rezultati dobiveni za 3 uzorka mokraće ispitanika.

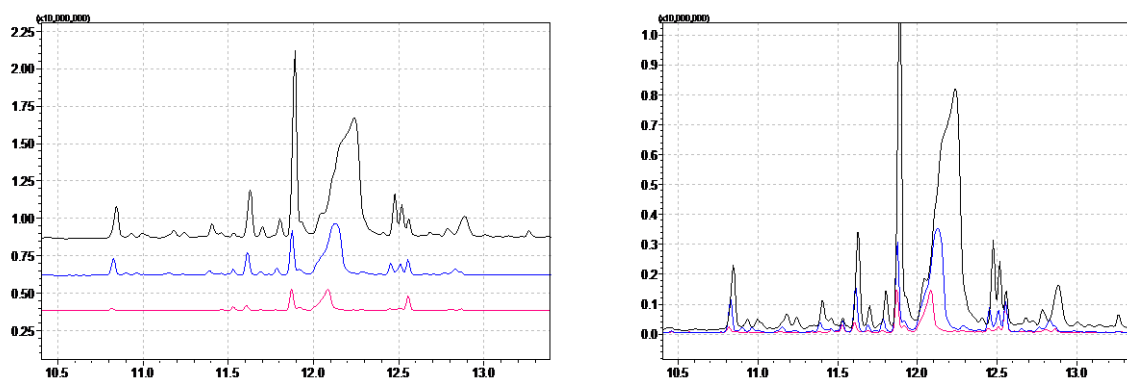
Na kromatogramu su vidljivi signali s pripadajućim retencijskim vremenima. Retencijsko vrijeme kafeina je 11,88, a teobromina 12,56. Vidljiv je porast koncentracija kafeina i teobromina, mjeren visinom – površinom signala, ovisno o vremenu uzimanja biološkog uzorka. Nakon 1 i 2 sata od konzumacije vidljiv je bolji odziv metilksantina.



Slika 15. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 1. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Milka Alpine Milk mliječne čokolade.



Slika 16. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 2. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Milka Alpine Milk mliječne čokolade.



Slika 17. Usporedba signala biološkog uzorka ispitanika br. 3. Crna linija – biološki uzorak natašte, plava linija – biološki uzorak nakon 1 sata, roza linija – biološki uzorak nakon 2 sata od konzumacije Milka Alpine Milk mliječne čokolade.

5. RASPRAVA

Kvalitativnom analizom uzoraka čokolade primjenom GC-MS metode dokazano je prisustvo kofeina i teobromina u svim ispitivanim uzorcima. Detektirani metilksantini su uspješno identificirani pomoću masenog spektrografa usporedbom dobivenih spektara masa sa spektrima masa iz baza podataka. Dobivenim rezultatima potvrđen je izbor kromatografske tehnike, GC-MS metode, za identifikaciju i određivanje metilksantina kao što su Monteiro i sur. pokazali svojom studijom. (47)

U ovom istraživanju se određivalo koja je metoda od korištenih prikladnija, odnosno koja daje bolji odziv metilksantina: SPE ili LLE metoda. Za pripremu bioloških uzoraka bila je potrebna LLE metoda, stoga se usporedilo daje li LLE metoda isti ili bolji odziv od SPE metode. Iz uspoređenih rezultata vidljivo je kako LLE metoda dalje bolji odziv od SPE metode te da je manje onečišćenja detektirano LLE metodom. Za usporedbu dviju metoda koristili smo rezultate dobivene analizom Dorina crne čokolade za kuhanje obzirom da je navedena čokolada dala najbolji odziv metilksantina.

Kvalitativno je analizirana koncentracija metilksantina u mokraći osoba koje su prethodno konzumirale preporučenu dnevnu dozu čokolade (30 grama) Iz literature je pronađen podatak kako je preporučena dnevna doza teobromina 500 mg/kg tjelesne mase. (48) Budući da je prosječna tjelesna masa ispitanika bila u rasponu od 55 do 65 kilograma, uzet je prosjek od 60 kilograma te temeljem navedenog došlo se do rezultata od 30 grama. Prvi dan osobe su konzumirale 30 grama Dorina čokolade za kuhanje, a drugi dan Milka Alpine milk mliječne čokolade. Posebna napomena je kako osobe nisu konzumirale čokoladu, kavu ili čaj najmanje 12 sati prije pokusa-konzumacije testne čokolade prikupljanja bioloških uzoraka. Biološki uzorci prikupljeni su natašte, 1 sata i 2 sata nakon konzumiranja čokolade. Koristio se navedeni vremenski razmak zbog literaturnih podataka koji navode da se metilksantini mogu detektirati u mokraći 2 sata nakon ingestije. (49) Ispitanici su bile žene različitih dobnih skupina Uzorci su analizirani LLE metodom te su dobiveni rezultati.

Analizom rezultata ispitanika nakon ingestije Dorina čokolade za kuhanje, može se primijetiti slijedeće: kod ispitanika 1 vidljiva je razlika u odzivu metilksantina kofeina i teobromina, ovisna o vremenu uzimanja uzorka. Naime, u uzorku izuzetom natašte nije dokazano prisustvo metilksantina, dok je vidljiv porast u uzorcima izuzetim sat i dva sata nakon ingestije čokolade. Kod ispitanika 3 uočen je rast odziva metilksantina uspoređuje li se rezultat uzorka izuzetog natašte i uzorka izuzetog 1 sat nakon ingestije. Međutim, ako se uspoređuje rezultat uzorka izuzetog 1 sat nakon ingestije i uzorka izuzetog 2 sata nakon

ingestije događa se pad odziva metilksantina. Kod ispitanika 3, kao kod ispitanika 1, uočen je rast odziva metilksantina uz iznimku uzorka izuzetog prije ingestije. Za razliku od rezultata ispitanika 1, kod ispitanika 3 u uzorku izuzetom natašte dokazano je prisustvo metilksantina. Navedeni rezultati mogu biti posljedica različite građe i tjelesne mase ispitanika, različitih dobnih skupina te različite brzine metabolizma.

Analizom rezultata ispitanika 2 i 3, vidljivo je da je kod oba ispitanika prisutan odziv kofeina u uzorku izuzetom natašte, tj izuzetom prije ingestije čokolade. Navedeno može biti posljedica što oba ispitanika svakodnevno konzumiraju kavu te se može pretpostaviti kako se kofein nije mogao eliminirati iz organizma kroz 12 sati apstinencije proizvoda koji sadrže metilksantine.

Važno je naglasiti kako je kod ispitanika 2 prisutno smanjenje odziva u uzorku izuzetom 1 sat nakon ingestije, a u uzorku natašte prisutan je odziv i kofeina i teobromina. Pretpostavlja se da je riječ o kontinuiranoj konzumaciji proizvoda koji sadrže metilksantine (kava, čaj, čokolada) te zbog navedenog nije došlo do nedostatka odziva u uzorku izuzetom natašte, a smanjenje odziva se pretpostavlja da je posljedica sporijeg metabolizma ispitanika 2 te da sat vremena od ingestije nije bio dovoljan vremenski interval da bi odziv ostao isti ili porastao nakon ingestije.

Nakon konzumacije 30 grama Milka Alpine Milk mliječne čokolade, uzorci su, kao i nakon konzumacije tamne čokolade, izuzeti natašte, 1 sat i 2 sata nakon ingestije. Kod svih ispitanika je zabilježen odziv metilksantina u svim izuzetim uzorcima. Vrijeme polueliminacije teobromina je 6,2 sata, a kofeina je 4,1 sat (50) što znači da bi se potpuno trebali izlučiti iz organizma kroz 24 sata. Kako su testiranja konzumacije tamne i mliječne čokolade obavljena uzastopno, dan za danom, može se pretpostaviti kako je zabilježeni odziv metilksantina u uzorku mokraće uzetom drugog dana, tj. prije ingestije mliječne čokolade, zapravo posljedica konzumacije tamne čokolade prethodni dan.

Kao i kod tamne čokolade, u rezultatima nakon ingestije mliječne čokolade vidljiv je rast odziva metilksantina kod ispitanika 1 i 2, dok se kod ispitanika 3 događa prvo rast i zatim pad odziva. Pretpostavlja se da je i ovdje riječ o različitoj građi ispitanika, tjelesnoj masi i godinama te različitoj brzini metaboličkih procesa svakog od ispitanika ponaosob.

Ovo istraživanje je polučilo dobre rezultate u postavljanju metode i određivanju prisustva metilksantina u uzorcima čokolade i uzorcima čokolade nakon njihove konzumacije. Dvojbe oko metabolizma i koncentracije metilksantina u biološkim uzorcima osoba mogle bi se rasvijetliti nekim budućim istraživanjem koje bi uključilo veći broj ispitanika, različitih navika i životne dobi oba spola.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspješno je kvalitativno dokazana prisutnost metilksantina u uzorcima 3 crne i 7 mliječnih čokolada.

2. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspješno je kvalitativno dokazana prisutnost metilksantina u biološkim uzorcima mokraće.

3. LLE metoda pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu od SPE metode. Nakon procesa obrade LLE metodom, detektirani su bolji odzivi uzoraka.

4. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspoređeni su rezultati dobiveni nakon pripreme bioloških uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće kod različitih ispitanika. Utvrđeno je kako jedan od ispitanika ima različite rezultate od preostala dva ispitanika te je potrebno provesti daljnja ispitivanja usporedbe.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health Benefits of Methylxanthines in Cacao and Chocolate. *Nutrients*. 2013; 5(10):4159-73.
2. <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/dt/c4dt03679d/unauth#!divAbstract> (pristup: 3.3.2018.)
3. Gu, Y.; Yu, S.; Lambert, J.D. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *Eur. J. Nutr.* 2013.
4. Redovniković, I.R.; Delonga, K.; Mazor, S.; Dragović-Uzelac, V.; Caric, M.; Vorkapic-Furac, J. Polyphenolic content and composition, and antioxidative activity of different cocoa liquors. *Czech J. Food Sci.* 2009, 27, 330–337.
5. Tzounis, X.; Rodriguez-Mateos, A.; Vulevic, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J.P. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 93, 62–72.
6. Hayek, N. Chocolate, gut microbiota, and human health. *Front. Pharmacol.* 2013; 4.
7. Tremaroli, V.; Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489, 242–249.
8. Nehlig, A. Is caffeine a cognitive enhancer? *J. Alzheimer's Dis.* 2010; 2, S85–S94.
9. Schiffman, S.S.; Gill, J.M.; Diaz, C. Methylxanthines enhance taste: Evidence for modulation of taste by adenosine receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1985; 22, 195–203.
10. Zambonin CG, Aresta A, Palmisano F. Determination of methylxanthines in urine by liquid chromatography with diode array UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004; 36: 621–624.
11. Smit HJ, Blackburn RJ. The reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005; 181: 101–106 (2005).
12. Baselt RC. Caffeine. In *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 5th ed. Biomedical Publications, Foster City, CA, 2000; 120–122.
13. McCusker RR, Goldberger BA, Cone EJ. Caffeine content of specialty coffees. *J. Anal. Toxicol.* 2003; 27: 520–522.
14. McCusker RR, Fuehrlein B, Goldberger BA, Gold MS, Cone EJ. Caffeine content of decaffeinated coffee. *J. Anal. Toxicol.* 2006; 30: 611–613.
15. Mirfazaelian A, Goudarzi M, Tarbatabaiefar M, Mahmoudian M. A quantitative thin layer chromatography method for determination of theophylline in plasma. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2002; 5:131–134.
16. Chou KH, Bell LN. Caffeine content of prepackaged national-brand and private-label carbonated beverages. *J. Food Sci.* 2007; 72: C337–342.

17. Kerrigan S, Lindsey T. Fatal caffeine overdose: two case reports. *Forensic Sci. Int.* 2005; 153: 67–69.
18. Grases F, Rodriguez A, Costa-Bauza A. Theobromine inhibits uric acid crystallization. A potential application in the treatment of uric acid nephrolithiasis. *PLoS One.* 2014;9(10):e111-184.
19. Baggott MJ, Childs E, Hart AB, de Bruin E, Palmer AA, Wilkinson JE, de Wit H. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;228(1):109-18.
20. Rios, L.Y.; Gonthier, M.P.; Remesy, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Lazarus, S.A.; Williamson, G.; Scalbert, A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77, 912-918.
21. Timbie, D.J.; Sechrist, L.; Kenney, P.G. Application of HPLC to the study of variables affecting theobromine and caffeine concentrations in cocoa beans. *J. Food Sci.* 1978; 43, 560-562.
22. USDA. United States Department of Agriculture, Nutrient Data Laboratory, 2008; <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
23. Morganelli. A. *The Biography of Chocolate.* Crabtree Publishing Company; 2006. 4.
24. <http://kblog.lunchboxbunch.com/2017/04/all-about-cacao-cocoa-chocolate.html> (pristup: 20.12.2017).
25. Whymper R. *Cocoa and chocolate : their chemistry and manufacture.* London: J. & A. Churchill, 1885.
26. Minifie BW. *Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology.* Director Books, 1980.
27. Beckett ST. *Industrial Chocolate Manufacture and Use.* Springer Science & Business Media; 2012.
28. Verna. R. The history and science of chocolate. *Malaysian J Pathol* 2013; 35(2) : 111 – 121.
29. Beckett ST. *The Science of Chocolate.* Royal Society of Chemistry; 2015.
30. Presilla ME. *The New Taste of Chocolate: A Cultural and Natural History of Cacao with Recipes.* Berkeley, CA: Ten Speed, 2009.
31. <https://www.coolinarika.com/magazin/prehrambeni-rjecnik/%C4%8D/cokolada-mlijecna/> (pristup: 20.9.2018.)

32. <http://www.mojacokolada.hr/novice/bijela-cokolada-kratka-povijest-i-njen-utjecaj-na-zdravlje-n213> (pristup: 20.9.2018.)
33. Sutlović D, Kovačić Z, Riha B. Dobra laboratorijska praksa. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 9-17.
34. Riha B. Uzimanje uzoraka za toksikološke analize živih osoba. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 303-10
35. <http://www.bioprocessintl.com/analytical/downstream-validation/distinctions-between-analytical-and-bioanalytical-test-methods-31823/> (pristup: 19.3.2018.)
36. Sutlović D. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 337-44.
37. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
38. Kaštelan-Macan M, Medić-Šarić M, Turina S. Uzorkovanje i priprava uzoraka. In: Plošna kromatografija. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2006. p. 92-7.
39. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399008328> (pristup: 24.3.2018.)
40. <https://chromspec.com/content/spe> (pristup: 24.3.2018.)
41. Cox M, Rydberg J. Introduction to Solvent Extraction. In: Rydberg J, Cox M, Musikas C, Choppin GR, editors. Solvent Extraction Principles and Practice. Second Edi. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 1-27.
42. Tomašek L, Bakulić L. Kriminalističko istraživanje, zapljena i analiza sredstava ovisnosti. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 337-44.
43. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Plinsko-tekućinska kromatografija. In: Osnove analitičke kemije. Školska knjiga; 1999. p. 674-92.
44. Pine SH. Organska kemija. Zagreb: Školska knjiga; 1994. p. 1130-1132.
45. Flanagan RJ i sur. Basic analytical toxicology. Geneva: World Health Organization; International Program on Chemical Safety; 1995.
46. <https://www.chem.purdue.edu/ric/instrumentation/gcms.php> (pristup: 18.3.2018.)
47. Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*. 2016 Jul 27;21(8).

48. Gil M.; Skopinska RE; Radomska D; Demkon U; Skurzak H; Rochowska M; Beauth J; Roszkowski K. Effect of purinergic receptor antagonists, suramin and theobromine on tumourinduced angiogenesis in BALB/C mice. *Folia. Biol. Praha.* 1993, 39, 63-68.
49. Kumazawa T; Seno H; Lee XP; Ishii A; Watanabe-Suzuki K; Sato K; Suzuki O. Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta* 1999, 387, 53-60.
50. Lelo A; Birkett DJ; Robson RA; Miners JO. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 1986, 22, 177-182.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Kvalitativno dokazati prisutnost metilksantina u uzorcima čokolade i biološkim uzorcima mokraće primjenom GC-MS metode. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme uzoraka čokolade različitim ekstrakcijskim metodama, (ekstrakcija čvrstom fazom i ekstrakcija tekuće-tekuće) te utvrditi koja je metoda prikladnija za pripremu uzoraka koji sadrže metilksantine. Usporediti rezultate analize dobivene nakon pripreme bioloških uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće kod različitih ispitanika

Materijali i metode: Korišteni su uzorci 11 čokolada (3 tamne i 8 mliječnih čokolada) u obliku čokoladnih pločica te biološki uzorci mokraće tri ispitanika. Uzorci čokolada prvotno su analizirani samostalno kako bi se odredilo prisustvo metilksantina. Nebiološki uzorci pripremljeni su ekstrakcijom čvrstom fazom (SPE metoda), dok su *Dorina čokolada za kuhanje* te biološki uzorci pripremljeni ekstrakcijom tekuće-tekuće (LLE metoda). Uzorci su otopljeni u malom volumenu kloroforma i analizirani na GC-MS uređaju metodom koja omogućava istovremeno snimanje ukupnog ionskog kromatograma (TIC) u području 40-600 m/z i snimanje samo odabranih iona (SIM).

Rezultati: U 10 uzoraka čokolade detektirani su teobromin i kofein. Također su detektirani u svim biološkim uzorcima. Uzorci pripremljeni za analizu LLE metodom dali su mnogo izraženije odzive na kromatogramu od uzoraka pripremljenih za analizu SPE metodom. Postoje razlike u signalima metilksantina u biološkim uzorcima različitih ispitanika.

Zaključci: Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspješno je kvalitativno dokazana prisutnost metilksantina u uzorcima 3 crne i 7 mliječnih čokolada te u biološkim uzorcima mokraće. LLE metoda pokazala je veću učinkovitost u pripremi uzoraka za analizu od SPE metode. Nakon procesa obrade LLE metodom, detektirani su bolji odzivi uzoraka. Analizom provedenom GC-MS tehnikom uspoređeni su rezultati dobiveni nakon pripreme bioloških uzoraka ekstrakcijom tekuće-tekuće kod različitih ispitanika. Utvrđeno je kako jedan od ispitanika ima različite rezultate od preostala dva ispitanika te je potrebno provesti daljnja ispitivanja usporedbe bioloških uzoraka.

9.SUMMARY

Diploma Thesis Title: Determination of methylxanthines in chocolate samples

Objectives:. Qualitatively demonstrate the presence of methylxanthine in chocolate samples and in biological urine samples using the GC-MS method. Compare the results of the analyzes obtained after the preparation of chocolate samples by various extraction methods (solid phase extraction and liquid liquid extraction) and determine which method is most suitable for the preparation of samples containing methylxanthine. Compare the results of the analysis obtained after the preparation of biological samples by liquid-liquid extraction at different subjects.

Material and Methods: In this study were used samples of 11 chocolates (3 dark and 8 milk chocolates) in the form of chocolate bars and biological samples of three subjects. Chocolate samples were initially analyzed individually to determine the presence of methylxanthine. Chocolate samples were prepared by solid phase extraction (SPE method), while *Dorina chocolate for cooking* and biological samples were prepared by liquid-liquid extraction (LLE method). Samples were dissolved in a small volume of chloroform and analyzed on a GC-MS method using mode that simultaneously records total ion chromatogram (TIC) in the area of 40-600 m / z and single ion monitoring (SIMs) scanning mode.

Results: In 10 chocolate samples and all biological samples, theobromine and caffeine were detected. Samples prepared for LLE analysis gave much more pronounced responses to the chromatogram than samples prepared for SPE analysis. There are differences in the methylsantine signals in urine samples in different subjects.

Conclusion: The analysis of GC-MS technique has successfully demonstrated the presence of methylxanthine in chocolate samples of 3 dark and 7 milk chocolates and in biological samples of urine. The LLE method showed greater efficiency in preparing samples

for analysis then the SPE method. After the LLE method, better pattern responses were detected. GC-MS technique analysis compares the results obtained after the preparation of biological samples by liquid-liquid extraction at different subjects. It was found that one of the subjects had different results from the remaining two subjects, and further comparison tests should be carried out.

Marija Đurđević rođena je 6. veljače 1994. godine u Splitu. Pohađala je osnovnu školu Don Lovre Katića u Solinu. 2008. godine postaje aktivni član u plesnoj sekciji KUD – a Salona u Solinu. Maturirala je 2012. godine s odličnim uspjehom u IV. gimnaziji Marka Marulića u Splitu. Iste godine upisuje Integrirani preddiplomski i diplomski studij farmacije Sveučilišta u Splitu. Na drugoj godini studija učlanjuje se u Udrugu studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA) te kao aktivni član Udruge djeluje od prosinca 2013. godine do listopada 2016. godine. U sklopu Udruge, dana 26. ožujka 2015. godine održala je predavanje o oralnom zdravlju učenicima drugog i trećeg razreda osnovne škole Manuš. Aktivan je član Akademskog pjevačkog zbora Sveučilišta u Splitu „Silvije Bombardeli“ od listopada 2017. godine. Stručno osposobljavanje završava u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, u ljekarničkoj jedinici Bačvice u razdoblju od ožujka do rujna 2018. godine. Tečno govori, piše i služi se engleskim jezikom.